

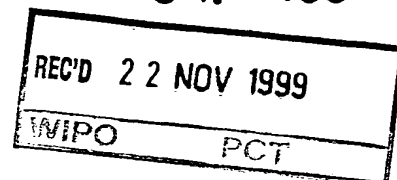
JP 99/05456

PCT/JP 99/05456

04.10.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年10月 5日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第282476号

出 願 人
Applicant (s):

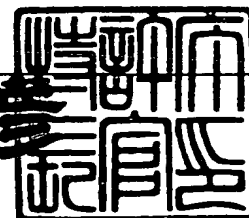
武田薬品工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3075799

【書類名】 特許願
 【整理番号】 A98161
 【提出日】 平成10年10月 5日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【国際特許分類】 C07K 1/12
 【発明の名称】 N末端メチオニンの除去方法
 【請求項の数】 4
 【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県川西市大和西1丁目54番地の16

【氏名】 西村 紀

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県川西市大和東3丁目7番地の5

【氏名】 浅野 常夫

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市中島11-15-302

【氏名】 末永 正人

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県北葛城郡上牧町服部台2丁目5番2号

【氏名】 大前 弘明

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台5丁目18番D-75-106号

【氏名】 奥谷 範雄

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】N末端メチオニンの除去方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を α -ジケトン類と反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基の除去方法。

【請求項2】 N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドが遺伝子工学的に製造されたペプチドである請求項1記載の方法。

【請求項3】 遺伝子工学的に製造されたペプチドがN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基が付加した成長ホルモンである請求項2記載の方法。

【請求項4】 遺伝子工学的に製造され、N末端にメチオニンが付加したヒト成長ホルモンまたはその塩をグリオキシル酸またはその塩と硫酸銅およびピリジンの存在下に反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端にメチオニンが付加していないヒト成長ホルモンまたはその塩の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、N末端にメチオニンを有するペプチド（蛋白質を含む）またはその塩から酢酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸およびギ酸ナトリウムの存在下、効率よくメチオニンを除去する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

蛋白質が細胞内で生合成される際には、そのN末端は mRNA の開始コドン AUG に対応するメチオニンから始まっていることが知られている。しかしながらこのメチオニンは以後のプロセッシングによって取り除かれてしまうため、完成

された成熟蛋白質分子にはもはや存在しないのが通例である。

遺伝子組換え技術の進歩により、有用な蛋白質を微生物や動物細胞、例えば大腸菌を用いて産生することが可能となったが、本手法により産生される蛋白質には、上記メチオニンが残存している例が見い出されている。例えば、大腸菌で発現させたヒト成長ホルモンにおいてメチオニンの付加率はほぼ100% [ネイチャー (Nature), 293, 408 (1981)] に達し、インターフェロン- α においては50% [ジャーナル・オブ・インターフェロン・リサーチ (J. Interferon Res.), 1, 381 (1981)]、非グリコシル化ヒトインターロイキン-2では、天然型ヒトインターロイキン-2と同じくアラニンではじまる分子種 (rIL-2) に加え、アミノ末端にさらにメチオニンの付加した分子種 (Met-rIL-2) の存在が認められている。

一方、N末端のアミノ酸を化学的に除去する方法としては、Dixon が、1964年に、DL-アラニルグリシンにグリオキシル酸、ピリジン、酢酸銅を反応させるとアミノ基移転反応が起こり、ピルボイルグリシンが生成すること [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 92, 661 (1964)]、さらに、化合物にチオセミカルバジドを反応させるとアミド結合の解裂が起こり、グリシンを生成することを報告している [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 90, 2C (1964)]。次いで、この反応をチトクロームC-551 (Pseudomonas cytochrome c-551) に応用し、N末端グルタミン酸が除去されることを報告している [バイオケミストリー・ジャーナル (Biochem. J), 94, 463 (1965)]。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

同じ蛋白質であっても、N末端にメチオニンの付加した分子種とそうでない分子種とは蛋白質の高次構造、生物活性、安定性が相互に異なる可能性があり、さらにメチオニンのN末端への付加が抗原性の増加をもたらす可能性もありうるものと考えられる。従って、産業利用上の観点から、この開始コドンに対応するN末端メチオニン除去法を確立することは意義あることと考えられる。

この課題を解決するため、臭化シアン (BrCN) 分解によってメチオニンを

取り除く方法が提案 [サイエンス (Science), 198, 1056 (1977)] されているが、この場合は所望の成熟蛋白質中にメチオニン残基が存在しないことが前提となる上、過酷な化学反応を蛋白質に付す該方法によっては、決して満足する結果は得られない。

N末端にメチオニン残基を有するペプチドまたは蛋白質から、ペプチドまたは蛋白質の種類に拘わらず、選択的かつ効率的に、N末端のメチオニン残基を除去することを可能とする化学的な方法EP-A-812856号に記載の方法以外には全く知られていないが、このことは、最終生産物となるペプチドまたは蛋白質を変性させることなく、マイルドな条件下でN末端メチオニンを除去しうる化学的な反応を見い出すことの困難性に起因すると考えられる。特に、分子量が比較的大きく、遺伝子工学的に製造される蛋白質、なかでも、医薬として用いることを目的とした蛋白質から、N末端に余分に付加したメチオニンを除去する場合、メチオニン除去後に蛋白質の活性が低下しないことが要求されるため、通常、弱酸性から弱アルカリの水溶液中で加熱することなく、反応を進行させる必要があり、化学的な反応条件としては制限が多いので、良好な反応条件を見い出せないのが現状であった。

【0004】

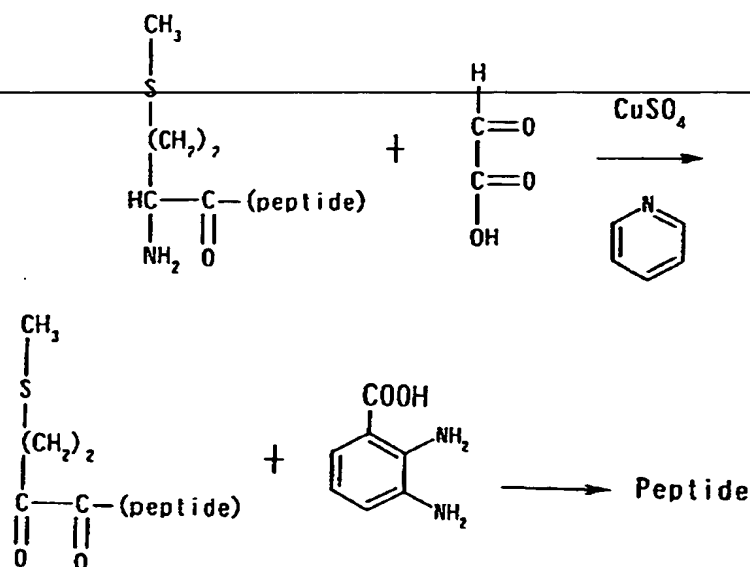
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、遺伝子工学的に製造される蛋白質におけるN末端のメチオニンのみを切断することによる、天然型のアミノ酸配列を有する蛋白質の製造法を提供すべく鋭意研究したところ、メチオニンの付加した蛋白質においてメチオニンを α -ジケトン体に変換した後、有機ジアミン類を作用させて、メチオニンの付加した蛋白質から、N末端メチオニンを除去する方法を見い出すべく鋭意努力した結果、下記のスキーム1に表されるとおり式(I)で表わされるメチオニンの付加したペプチドまたは蛋白質に、塩基であるグリオキシル酸、遷移金属イオンを供与しうる硫酸銅、アミン類であるピリジンと反応させて、アミノ基移転反応を行い、メチオニンを α -ジケトン体に変換した後、さらにジアミン類である3,4-ジアミノ安息香酸と酢酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸およびギ酸ナトリウムの存在下に反応させて加水分解反応を行うことにより、メチオニンの付加

したペプチドまたは蛋白質から、N末端メチオニンを除去し、その活性を低下させることなく、N末端にメチオニンの付加していないペプチドまたは蛋白質を予想外にも高収率で得る方法を見出し、さらに研究を進め、本発明を完成させるに至った。

(スキーム1)

【化1】



〔式 (I) 中、Xはアミノ酸残基または2以上の任意のアミノ酸数を有するペプチド鎖であればいずれでもよいが、実用的な面からは、遺伝子工学的に製造された蛋白質のXに対応する部分のペプチド鎖が挙げられる。なお、本願明細書において、蛋白質あるいはペプチドと称する場合、複数のアミノ酸からなるペプチドまたは蛋白質は、非グリコシル化またはグリコシル化ペプチドまたは蛋白質のいずれであってもよい。〕

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩をα-ジケトン類と反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とする該メチオニン残基の除去方法

(2) N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドが遺伝子工学的に製造されたペプチドである前記(1)記載の方法、

(3) 遺伝子工学的に製造されたペプチドがN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基が付加した成長ホルモンである前記(2)記載の方法、

(4) 遺伝子工学的に製造され、N末端にメチオニンが付加したヒト成長ホルモンまたはその塩をグリオキシル酸またはその塩と硫酸銅およびピリジンの存在下に反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウム、ギ酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸および酢酸ナトリウムの存在下に3, 4-ジアミノ安息香酸またはその塩と反応させることを特徴とするN末端にメチオニンが付加していないヒト成長ホルモンまたはその塩の製造法、

【0006】

本明細書において、酸化されていてもよいメチオニン残基は、メチオニン残基またはそのS酸化体を示し、メチオニン残基のS酸化体としては、スルホキシドおよびスルホン体が挙げられる。

N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたは蛋白質としては、式 $\text{CH}_3\text{-S(O)}_m\text{-(CH}_2)_2\text{-CH(NH}_2\text{)-CO-X}$ [式中、mは0ないし2の整数を示し、Xはアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す。] で表されるペプチドまたは蛋白質が挙げられ、これらは塩を形成してもよく、塩としては、本発明の反応を阻害しないものであれば何れでもよいが、中でも薬学的に許容可能な塩が好ましく、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸など無機酸との塩、酢酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などの有機酸との塩、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩などが挙げられる。

【0007】

上記式中、mとしては0が好ましい。また、Xとしてはアミノ酸の数が2以上のペプチド鎖が好ましい。

本発明の除去方法に用いるペプチドとしては、アミノ酸数が50未満のいわゆるペプチドあるいはアミノ酸数が50以上のいわゆる蛋白質の何れであってもよ

い。

このように、本願明細書において、「ペプチド」で示される用語は、アミノ酸数が50未満の分子のみならず、アミノ酸数が50以上の分子をも含むものであるが、なかでも、アミノ酸数が50以上の分子（いわゆる蛋白質）が好ましく用いられる。

好ましいペプチドとしては、アミノ酸数が2ないし1000であるペプチド、さらに好ましくはアミノ酸数が15ないし500であるペプチドが挙げられ、その具体例としては、~~成長ホルモン（GH）類（例えば、20K-hGH、22K-hGHなど）、副甲状腺ホルモン（PTH）、インシュリン、神経成長因子、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、グリア由来神経栄養因子、ニューロトロフィン-3、4または6、中枢神経成長因子、グリア成長因子、肺由来神経栄養因子、上皮細胞成長因子、繊維芽細胞成長因子、血小板由来成長因子、トランスフォーミング成長因子 α または β 、血管内皮細胞成長因子、ティッシュ・プラスミノゲン・アクチベータ、ウロキナーゼ、プロテインC、トロンボモジュリン、骨形成因子、カルシトニン、インスリン様成長因子、インターフェロン α 、 β または γ 、インターロイキン-1（ α 、 β ） \sim 12、顆粒コロニー刺激因子、顆粒マクロファージ・コロニー刺激因子、顆粒マクロファージ刺激因子、トロンボポエチン、エリスロポイエチン、PACAP、心房性ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、巨核球成長因子、血液幹細胞成長因子、肝細胞成長因子、モチリン、イムノトキシン、腫瘍壊死因子、ヒルジン、コルチコトロピン、アンジオテンシン、アンジオテンシン2およびそのペプチド性拮抗薬、アンジオテンシン3、ブラジキニン類、ブラジキニン増強因子、 α 、 β または γ エンドルフィン、エンケファリン、好球中走化性因子、ガストリン、グルカゴン、成長ホルモン放出因子、キョウトルフィン、カリジン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、肥満細胞脱顆粒ペプチド、メラニン細胞刺激ホルモン、ニューロテンシン、トリプシンインヒビター、オキシトシン、プロインシュリンC-ペプチド、セクレチン、ソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、ユビキチン、ウロガストロン、バソプレッシン類、キニン類、タフトシン、ソマトメジン、コルチコトロピン放出因子、インスリン様成長因子、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、PT~~

HrP、VIP、DHI、インスリノトロピン、GRP、CCK-PZ、Galanin（ガラニン）、アカトラムペプチド（Antrum Peptide）、PPY、Pancreatic Polypeptide、PSP、パンクレアスタチン、hCG、hCS、リラキシン、血清胸腺因子、サイモポイエチン、サイモシン、ファクターXIII、ファクターVIII、プロウロキナーゼ、SOD、ファクターVIIa、アンチトロンビンなどの蛋白質およびそれらのムテイン（天然型の蛋白質に1つ以上のアミノ酸が置換、欠損または付加し、天然の蛋白質と同等またはそれ以上の生物学的または免疫学的活性を示すもの）など、あるいは化学合成などにより製造される公知または新規のペプチドなどが挙げられるが、なかでも、遺伝子工学的に製造された蛋白質、とりわけ、遺伝子工学的に製造され、N末端に酸化されていてもよいメチオニンが付加した成長ホルモン類（例えば、20K-hGH、22K-hGHなど）、ニューロトロフィン-3、ベータセルリン、副甲状腺ホルモン、インターロイキン-2、特に成長ホルモン類（例えば、20K-hGH、22K-hGHなど）などが好ましく用いられる。

上記した天然型の蛋白質は、何れの動物種由来のものであってもよいが、実用的には、ヒト由来の蛋白質が好ましく用いられる。

上記の蛋白質はN末端Metの除去工程に付す前あるいは後にリフォールディング（活性化、再生化）を行うことができる。

【0008】

本明細書において、 α -ケトン類は、上記したペプチドまたはその塩のアミノ基移転反応を進行させうるものであれば何れでもよく、例えば式 $R^1-CO-CO-R^2$ [式中、 R^1 は水素またはカルボキシル基で置換されていてもよい低級アルキルもしくはフェニル基（好ましくは水素またはメチル、さらに好ましくは水素）を示し、 R^2 は水酸基、低級アルコキシ基または低級アルキルで置換されていてもよいアミノ基（好ましくは水酸基）を示す。] で表される化合物またはその塩などが挙げられる。

上記式中、 R^1 で示される低級アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、ブチル、i-ブチル、sec-ブチル、t-ブチルなどの炭素数1ないし6程度のアルキル基などが挙げられ、 R^2 で示される低級アルコキ

シ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、*i*-プロポキシ、ブトキシ、*i*-ブトキシ、*sec*-ブトキシ、*tert*-ブトキシなどの炭素数1ないし6程度のアルコキシ基などが挙げられる。また、 R^2 で示される低級アルキルで置換されていてもよいアミノ基としては、前記した R^1 で示される低級アルキル基を1ないし2個有していてもよいアミノ基などが挙げられる。さらに、塩としては、上記したペプチドまたは蛋白質の塩と同様なものが挙げられる。

α -ジケトン類の具体例としては、グリオキシル酸、ピルビン酸、オキサリ酢酸、フェニルグリオキシル酸、~~2-オキソゲルタル酸~~などが挙げられるが、なかでも、グリオキシル酸が好ましく用いられる。

α -ジケトン類は塩を形成していてもよく、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩などがあげられる。

【0009】

N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩と α -ジケトン類とのアミノ基転移反応は、通常、ペプチドまたはその塩1モルに対して、1ないし1万モル（好ましくは2000ないし4000モル）程度の α -ジケトン類を、約0ないし70℃（好ましくは約20ないし40℃）で約10分ないし5時間（好ましくは約20分ないし2時間）反応させるのが好ましい。上記したアミノ基転移反応を阻害しないものであれば何れの緩衝液（例、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液など）を用いてもよいが、なかでも、酢酸緩衝液が好ましく用いられる。また、反応のpHは、約2ないし9、なかでも、約4ないし7、とりわけ、約5ないし6に調整して反応を進行させるのがよい。

該アミノ基転移反応を促進するため、遷移金属イオンの存在下に α -ジケトン類を反応させることが好ましく、通常、 α -ジケトン類1モルに対して、0.001ないし0.1モル（好ましくは0.01ないし0.05モル）程度の遷移金属イオンを用いるのが好ましい。遷移金属イオンとしては、例えば、銅イオン（ Cu^+ , Cu^{2+} ）、コバルトイオン（ Co^{2+} , Co^{3+} ）、ニッケルイオン（ Ni^{2+} , Ni^{3+} ）、鉄イオン（ Fe^{2+} , Fe^{3+} ）、亜鉛イオン（ Zn^{2+} ）、アルミニウムイオン（ Al^{3+} ）、マンガニオン（ Mn^{2+} など）、ガリウムイオン（ Ga^{3+} ）、インジウムイオン（ In

3^+ ）、マグネシウムイオン (Mg^{2+})、カルシウムイオン (Ca^{2+}) などを用いることができるが、なかでも、銅イオン、コバルトイオンなど、とりわけ、銅イオン (Cu^{2+}) が好ましく用いられる。これらの遷移金属イオンは、通常、硫酸、硝酸、塩酸、過塩素酸などの無機酸との塩または酢酸、シュウ酸、クエン酸、炭酸などの有機酸との塩として、反応溶媒に添加することができ、なかでも、硫酸銅、酢酸銅、とりわけ、硫酸銅が好ましく用いられる。

【0010】

また、塩基の存在下に α -ジケトン類を反応させることが好ましく、通常、 α -ジケトン類 1 モルに対して、0.1 ないし 20 モル（好ましくは 0.5 ないし 10 モル）程度の塩基を用いるのが好ましい。塩基としては、例えば、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどのアルキルアミン類、N, N-ジメチルアニリン、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、イミダゾールなどの芳香族アミン類、尿素などの有機塩基などを用いることができるが、なかでも、芳香族アミン類、とりわけ、ピリジンが好ましく用いられる。

【0011】

さらに、上記したアミノ基転移反応は、遷移金属イオンおよび塩基の存在下に α -ジケトン類を反応させることが好ましく、実用的には、遷移金属イオン、塩基および α -ジケトン類の 3 成分（例えば、硫酸銅、ピリジンおよびグリオキシル酸など）を含有する混合液を、N 末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドまたはその塩を含有する水溶液に添加して、アミノ基転移反応を進行させる。

該アミノ基転移反応により得られ、式 $CH_3-S(O)_m-(CH_2)_2-CO-CO-X$ [式中、 m は 0 ないし 2 の整数を示し、 X はアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す。] で表される化合物またはその塩は、ペプチドまたは蛋白質の公知精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から単離・精製することもできるが、そのまま次の加水分解反応に付することもできる。

アミノ基転移反応で得られたジケトン体は、通常、塩基による加水分解反応に付して、N 末端の酸化されていてもよいメチオニン残基が除去されたアミノ酸、ペプチドまたはその塩に変換することができる。

【0012】

加水分解反応に用いる塩基としては、例えば、システアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミンなどのアルキルアミン類またはその塩、N,N-ジメチルアニリン、ピリジン、ルチジン、コリジン、4-(ジメチルアミノ)ピリジン、イミダゾールなどの芳香族アミン類またはその塩、o-フェニレンジアミン、トリレン-3,4-ジアミン、3,4-ジアミノ安息香酸およびそのN-アルキル置換体（例えば、N-メチル-1,2-フェニレンジアミン、N-エチル-1,2-フェニレンジアミン、N-イソプロピル-1,2-フェニレンジアミンなど）、2,3-ジアミノフェノール、4-クロロ-o-フェニレンジアミンなどのジアミン類（好ましくは芳香族ジアミン類、なかでも、3,4-ジアミノ安息香酸およびそのN-アルキル置換体（例えば、N-メチル-1,2-フェニレンジアミン、N-エチル-1,2-フェニレンジアミン、N-イソプロピル-1,2-フェニレンジアミンなど）またはそれらの塩など、チオセミカルバジド、アセトンチオセミカルバジド、フェニルチオセミカルバジドなどのチオセミカルバジド類、セレノセミカルバジド、アセトンセレノセミカルバジドなどのセレノセミカルバジド類などのアミン類またはその塩などを用いることができるが、なかでも、アミン類、とりわけ、ジアミン類またはチオセミカルバジド類またはそれらの塩が好ましく用いられ、特に、3,4-ジアミノ安息香酸またはその塩が好ましく用いられる。

加水分解反応に用いられる塩基の塩としては、例えば上記のペプチドまたは蛋白質の塩と同様のものなどがあげられる。

【0013】

塩基の量は、通常、ジケトン体1モルに対して約1ないし1万モル、好ましくは約500ないし3000モルである。加水分解反応は、通常、約0ないし70℃（好ましくは約20ないし40℃）で約1時間ないし7日間（好ましくは約10時間ないし5日間）で進行させるのが好ましい。反応には、緩衝液を溶媒として用いることが好ましく、緩衝液としては、例えば、ギ酸系緩衝液（例えば、酢酸-ギ酸ナトリウム、ギ酸-ギ酸ナトリウム、ギ酸-酢酸ナトリウムなど）などが挙げられる。上記した加水分解反応を阻害しないものであれば何れの緩衝液を

用いてもよいが、なかでも、酢酸－ギ酸ナトリウム、ギ酸－ギ酸ナトリウムまたはギ酸－酢酸ナトリウム緩衝液が好ましく用いられる。また、反応の pH は、約 2 ないし 9、なかでも、約 3 ないし 7、とりわけ、約 4 ないし 6 に調整して、反応を進行させるのがよい。これらの緩衝液は、好ましくは 0.5～6 mol/L 用いられる。

このようにして得られるアミノ酸、ペプチドまたはその塩は、公知の精製手段、例えば、抽出、塩析、分配、再結晶、クロマトグラフィーなどにより、反応溶液から単離・精製することもできるが、好ましい例として、例えば、SP-セファロース（ファルマシア バイオテック（株））あるいは、DEAE-5PW（東ソー（株））を介したイオン交換クロマトグラフィーなどによる精製法が挙げられる。

【0014】

本発明により製造されるポリペプチドはその N 末端にメチオニンを有さず、また天然の生理活性ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するものとして得られるので、天然のポリペプチドと同様の活性を有し低毒性で安全に医薬品や診断用薬剤として使用できる。

本発明により、メチオニンの付加したペプチドから N 末端メチオニンを特異的に除去することができる。

本発明の明細書および図面においてアミノ酸等の略号で表示する場合には、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下に示す。またアミノ酸に関して光学異性がある場合は、特に明示しなければ L-体を示す。

【0015】

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

Gly : グリシン

Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

Ile : イソロイシン

Ser : セリン
Thr : スレオニン
Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Gln : グルタミン
Asp : アスパラギン酸

Asn : アスパラギン
Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニルアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン
Pro : プロリン
Asx : Asp + Asn
Glx : Glu + Gln

【0016】

【発明の実施の形態】

以下の参考例および実施例によって本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

【0017】

【実施例】

参考例 1 (T7 プロモーターを用いたヒト成長ホルモン (hGH) 発現ベクターの構築)

hGH の構造遺伝子は、ヒト下垂体 cDNA ライブラリー (Quick-Clone, CLONTECH 社製) より、構造遺伝子の開始コドン上流に隣接して Nde I 切断部位を持つプライマー、及び始終コドン下流に隣接して Bam HI 切断部位を持つプライマーを用いて、PCR で増幅して回収した。これによ

り得られた両端に制限酵素認識部位が付加したhGH酵素遺伝子を、pT7BlueのT-クローニング部位に連結して(DNA Ligation Kit Ver. 2、宝酒造株式会社製)pT7HGH-Naを作製した。これを、大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。

一方、以下の方法で発現ベクターを構築した。pBR322をNde Iで切断、T4 DNAポリメラーゼ(DNA Blunting Kit、宝酒造株式会社製)で末端を平滑化し、再度連結することによって、Nde I認識部位

を欠損させたpBRdesNdeを作製した。pET3cをBgl II-Eco RVで切断し、約0.26kbpの断片を回収した後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNdeのSca I断片と連結して、pBR/T7desNdeを作製した。また、部位特異的変異導入(Quick Change, STRATAGENE社製)により、pBR322のBam HI認識部位を欠損させたpBR322desBamを作製した。pBR322desBamのSph I-Eco RV断片をpBR/T7desNdeのSph I-Eco RV断片と連結してテトラサイクリン耐性発現ベクターpTCを作製した。テトラサイクリン耐性遺伝子とT7プロモーターの向きが逆のものをpTC1、同じものをpTC2とした。

pT7HGH-NaをNde I及びBam HIで切断してhGH構造遺伝子を回収し、pTC1のNde I-Bam HI断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してアンピシリン耐性で形質転換体を選択、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCHGH-Naとした。

大腸菌MM294を、T7ファージのRNAポリメラーゼ遺伝子で組換えられているラムダファージ(スチュディエ、スプラ)で溶原化した。その後、hGH発現ベクターpTCHGH-Naをこの大腸菌MM294(DE3)へ導入し、大腸菌MM294(DE3)/pTCHGH-Naを得た。なお、hGHの塩基配列は、pT7HGH-Naを作製した時点でABI Prism 477A DNAシーケンサーによって確認した。

【0018】

参考例2（大腸菌でのMet-hGHの発現）

参考例1で得た形質転換細胞を、5mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1リットルを含む2リットル容フラスコ中で30℃、16時間振とう培養した。得られた培養液を、0.02%ニューポールLB-625（消泡剤：三洋化成工業製）および5mg/Lのテトラサイクリンを含む20リットルのLB培地を仕込んだ50リットル容発酵槽へ移植して、37℃、6時間通気攪拌培養した。この培養液を360リットルの主発酵培地（1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.05%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、3.0%ハイケースアミノ、1.0%酵母エキス）を仕込んだ500リットル容発酵槽に移植して、37℃で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1200クレット単位になった時点で17.85mg/L分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）を添加し、さらに24リットルの30%ブドウ糖を添加しながら培養を続け、5時間後に培養液を遠心分離して、約12.3kgの湿菌体を得、-80℃に凍結保存した。

上記の形質転換大腸菌MM294（DE3）/pTCHGH-Naは、受託番号FERM P-16546として平成9年12月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託され、また受託番号IFO 16124として財団法人発酵研究所（IFO）に平成9年10月16日に寄託されている。

【0019】

実施例1（Met-hGHの活性化）

参考例2で得られた菌体2kgに50mMトリス/HCl、8Mグアニジン塩酸塩溶液（pH8.0）6リットルを加えて菌体を溶解してから超音波破碎器（ソニファイアー450、ブランソン社）を用いて破碎処理を行った後、遠心分離（10000rpm、120分間）を行った。得られた上澄液6リットルに50

mMトリス/HCl、0.28mMGSSG、1.4mMGSH、0.7Mアルギニン（pH8.0）18リットルを加えてpH8.0に調整した後、4℃で4日間活性化を行った。

【0020】

実施例2（Met-hGHの精製）

実施例1で活性化の終了した再生液をペリコンカセットシステム（PTGC膜、ミリポア社）で、20mMトリス/HCl、2.5M尿素（pH8.0）を加えながら電気伝導度が10mS以下になるまで脱塩、濃縮を行った後、得られた濃縮液5リットルに50mMリン酸緩衝液（pH6.0）を加えて50リットルに希釈後4℃に一晩静置した。ついで、連続遠心分離（JCF-Zロータ、ベックマン社）を行い、得られた上清50リットルに10M水酸化ナトリウムを加えてpH7.12に調整した後ペリコンカセットシステム（PTGC膜、ミリポア社）で濃縮し、20mMトリス/HCl（pH8.0）に置換後、遠心分離（10000rpm、30分）を行い上清を得た。ついでこの液を20mMトリス/HCl（pH8.0）で平衡化したDEAE-トヨパール650Mカラム（20cmφ×84cm、東ソー社）に吸着させ、十分に洗浄した後、20mMトリス/HCl、50mM塩化ナトリウム（pH8.0）で溶出を行い、Met-hGH画分として95リットルの溶出液を得た。さらに、この溶出液をペリコンカセットシステム（PTGC膜、ミリポア社）で濃縮、脱塩し、20mMトリス/HCl、6M尿素（pH8.0）に置換し、12.21グラムのMet-hGHを得た。

【0021】

実施例3（N末端Metの除去）

実施例2で得たMet-hGH溶液1800ミリリットルに2.5Mグリオキシル酸、40mM硫酸銅、50%ピリジン溶液450ミリリットルを加えよく攪拌した後25℃で60分間反応させた。次いで、20mMトリス/HCl、4.0M尿素（pH8.0）で平衡化したセファデックスG-25カラム（11.3cmφ×125cm、ファルマシアバイオテック社）に3リットル/hの流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、Met-hGHのジケトン体画分と

して4.2リットルの溶出液を得た。この溶出液を1.2M酢酸、2.4Mギ酸ナトリウム、3.6M尿素溶液、48mM3,4-ジアミノ安息香酸溶液20.8リットル中によく攪拌しながら加えた後、30℃でゆっくり攪拌しながら3日間反応させた。反応後、この溶液をペリコンカセットシステム（PTGC膜、ミリポア社）で14リットルに濃縮し、7リットルずつ2回に分けて20mMトリス/HCl、4.0M尿素（pH8.0）で平衡化したセファデックスG-25カラム（25.2cmφ×50cm、ファルマシアバイオテク社）に6リットル/hの流速で通液し、hGH画分20リットルを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法（ギルソンHPLCシステム、ギルソン社）により、この溶液をDEAE-5PWカラム（21cm×30cm、東ソー社）に通液吸着させた後、A=50mMトリス/HCl+2.5M尿素（pH8.0）、B=50mMME S [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]+2.5M尿素（pH4.0）とによる70～85% BのpH勾配で、70分間、320ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分5.84リットルを得た。このhGH画分に10MNaOH溶液を16ミリリットル加えてpH7.1に調整後、8回に分けて高速液体クロマトグラフ法（ギルソンHPLCシステム、ギルソン社）によるクロマトグラフィーを行った。所定量の濃縮液をPOROS20R1カラム（5cm×60cm、日本パーセプティブ社）に通液吸着させた後、A=25% n-プロパノール+75% 50mMトリス/HCl（pH8.5）、B=35% n-プロパノール+65% 50mMトリス/HCl（pH8.5）とによる50～85% Bの濃度勾配で、150分間、50ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分として34.7リットルの溶出液を得た。この溶出液に蒸留水を加えて200リットルに希釈してからペリコンカセットシステム（PTGC膜、ミリポア社）で5リットルに濃縮後更に、高速液体クロマトグラフ法（ギルソンHPLCシステム、ギルソン社）により、この溶液を3回に分けてDEAE-5PWカラム（10.8cm×20cm、東ソー社）に通液吸着させた後、A=50mMトリス/HCl+2.5M尿素（pH8.0）、B=50mMME S [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]+2.5M尿素（pH4.0）とによる70～85% BのpH勾配で、70分間、80ミリリットル/分の流速で溶出を行い、hGH画分1616ミリリットルを得た。このhG

H画分に10MNaOH溶液を2ミリリットル加えてpH7.1に調整後、限外ろ過装置（オメガ膜、富士フィルター社）で濃縮し、濃縮液0.4リットルを得た。この濃縮液を蒸留水で平衡化したセファクリルS-100カラム（11.3cmφ×50cm、ファルマシアバイオテク社）に2リットル/hの流速で通液、展開しhGH画分を得た。更に、この溶液をミリパック60（ミリポア社）でろ過し、hGH溶液2391ミリリットル（4638ミリigramのhGH）を得た。

【0022】

実施例4（hGHの特徴決定）

（a）SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例3で得られたhGHに100mMDTTを含むサンプルバッファ [Laemmli, Nature, 227, 680 (1979)] を等量加えてよく攪拌し、95℃で2分間加熱後、マルチゲル10/20（第一化学薬品）で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクマシー・ブリリアント・ブルー (Coomassie Brilliant Blue) で染色した結果、約22KDaに単一のバンドが認められたことから、精製hGHは単一であることが確認された（図1）。

（b）N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社、モデル477A）を用いて決定した。その結果、得られたhGHのN末端アミノ酸配列はcDNAの塩基配列から推定されたhGHのN末端アミノ酸配列と一致した（表1）。

【表 1】

残基No	検出された PTH ¹⁾ - アミノ酸 (pmol)	hGHの塩基配列 から予測される アミノ酸
1	Phe (848)	Phe
2	Pro (520)	Pro
3	Thr (403)	Thr
4	Ile (620)	Ile
5	Pro (401)	Pro
6	Leu (429)	Leu
7	Ser (92)	Ser
8	Arg (262)	Arg
9	Leu (376)	Leu
10	Phe (283)	Phe
11	Asp (182)	Asp
12	Asn (175)	Asn
13	Ala (175)	Ala
14	Met (194)	Met
15	Leu (261)	Leu
16	Arg (181)	Arg
17	Ala (144)	Ala
18	His (80)	His
19	Arg (152)	Arg
20	Leu (200)	Leu
21	His (71)	His

1) フェニルチオヒダントイン

1 nmol を用いて分析を行った。

(c) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (L-8500A, 日立) を用いて決定した。

その結果、得られた hGH のアミノ酸組成は cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した（表 2）。

【表 2】

アミノ酸	1 モル当たりの 残基数	hGH の塩基配列 から予測される値
Asx	19.8	20
Thr ¹⁾	9.7	10
Ser ¹⁾	16.1	18
Glx	27.0	27
Pro	7.7	8
Gly	8.0	8
Ala	6.9	7
Cys ²⁾	N. D.	4
Val	6.8	7
Met	2.9	3
Ile	7.4	8
Leu	26.6	26
Tyr	7.9	8
Phe	12.4	13
His	3.0	3
Lys	8.7	9
Arg	10.7	11
Trp	0.9	1

酸加水分解（6N HCl-4%トリカリン酸、110℃、24 及び 48 時間加水分解の平均値）

1) 0 時間に外挿した値。2) 未検出

約 10 μ g を用いて分析をおこなった。

(d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計(L-8500A, 日立)を用いて決定した。得られたhGHのC末端アミノ酸はcDNAの塩基配列から推定されたC末端アミノ酸と一致した(表3)。

【表3】

C末端アミノ酸	回収率 (%)
P h e	94

気相ヒドラジン分解法(100℃、6時間)

20nmolを用いて分析を行った。

【0023】

実施例5(hGHの活性測定)

実施例3で得られた精製hGHのNb2細胞[ジャーナル・オブ・クリニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム、51巻、1058頁(1980)]に対する増殖促進効果は、標準品(ケミコンインターナショナル社、Temecula, California, USA)と同等であった。

【0024】

実施例6(N末端Metの除去)

実施例3で得たMet-hGHのジケトン体画分0.4ミリリットルに20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)を加えて2ミリリットルに希釈した。この希釈液に等量の4M酢酸、4M酢酸ナトリウム、6M尿素溶液、80mM N-メチル-1,2-フェニレンジアミン溶液を加え、よく攪拌した後30℃で20時間反応させた。反応後、この溶液を20mMトリス/HCl、4.0M尿素(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(1cmφ×30cm、ファルマシア社)に60ミリリットル/hの流速で通液し、hGH画分10ミリリットルを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法(ギルソンHPLCシステム、ギルソン社)により、この溶液をDEAE-5PWカラム(

2. 15 cm×15 cm、東ソー社)に通液吸着させた後、A=50 mM トリス／HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B=50 mM MES [2-(N-メチル)イタリル酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0) とによる 70～85% B の pH 勾配で、70 分間、7.5 ミリリットル／分の流速で溶出を行い、hGH を得た。

【0025】

実施例 7 (N 末端 Met の除去)

実施例 3 で得た Met-hGH のジケトン体画分 0.4 ミリリットルに 20 mM トリス／HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) を加えて 2 ミリリットルに希釈した。この希釈液に等量の 2 M 酢酸、4 M ギ酸ナトリウム、6 M 尿素溶液、80 mM N-メチル-1, 2-フェニレンジアミン溶液を加え、よく攪拌した後 30℃ で 20 時間反応させた。反応後、この溶液を 20 mM トリス／HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1 cmφ×30 cm、ファルマシア社) に 60 ミリリットル／h の流速で通液し、hGH 画分 10 ミリリットルを集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を DEAE-5PW カラム (2.15 cm×15 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A=50 mM トリス／HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B=50 mM MES [2-(N-メチル)イタリル酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0) とによる 70～85% B の pH 勾配で、70 分間、7.5 ミリリットル／分の流速で溶出を行い、hGH を得た。

【0026】

実施例 8 (N 末端 Met の除去)

実施例 2 で得た Met-hGH 溶液 1.8 ml に 2.5 M グリオキシル酸、40 mM 硫酸銅、50% ピリジン溶液 0.45 ml を加えよく攪拌した後 25℃ で 60 分間反応させた。ついで、20 mM トリス／HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 cmφ×30 cm、ファルマシアバイオテック社) に 100 ml/h の流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、Met-hGH のジケトン体画分として 10 ml の溶出液を得た。この溶出液を 1.2 M 酢酸、2.4 M ギ酸ナトリウム、3.6 M 尿素溶液、48 mM 3, 4-ジアミノ安息香酸溶液 49.5 ml 中によく攪拌しながら

加えた後、37℃でゆっくり攪拌しながら24時間反応させた。反応後、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (4.6 cm ϕ \times 60 cm、ファルマシアバイオテク社) に 500 ml/h の流速で通液し、hGH 画分 150 ml を集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を DEAE-5PW カラム (2.15 cm \times 15 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A = 50 mM トリス/HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B = 50 mM ~~MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0)~~ とによる 70-85% B の pH 勾配で、70 分間、7.5 ml/分の流速で溶出を行い、6.7 mg の hGH を得た。

【0027】

実施例 9 (N 末端 Met の除去)

実施例 2 で得た Met-hGH 溶液 1.8 ml に 2.5 M グリオキシル酸、40 mM 硫酸銅、50% ピリジン溶液 0.45 ml を加えよく攪拌した後 25℃で 60 分間反応させた。ついで、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (1.5 cm ϕ \times 30 cm、ファルマシアバイオテク社) に 100 ml/h の流速で通液し、平衡化と同じ緩衝液を用いて展開し、Met-hGH のジケトン体画分として 10 ml の溶出液を得た。この溶出液を 2 M ぎ酸、10 M ぎ酸ナトリウム、6 M 尿素溶液、80 mM 3,4-ジアミノ安息香酸溶液 10 ml 中によく攪拌しながら加えた後、30℃でゆっくり攪拌しながら 3 日間反応させた。反応後、20 mM トリス/HCl、4.0 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (4.6 cm ϕ \times 60 cm、ファルマシアバイオテク社) に 500 ml/h の流速で通液し、hGH 画分 100 ml を集めた。ついで、高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を DEAE-5PW カラム (2.15 cm \times 15 cm、東ソー社) に通液吸着させた後、A = 50 mM トリス/HCl + 2.5 M 尿素 (pH 8.0)、B = 50 mM ~~MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸] + 2.5 M 尿素 (pH 4.0)~~ とによる 70-85% B の pH 勾配で、70 分間、7.5 ml/分の流速で溶出を行い、6.0

mg の hGH を得た。

【0028】

実施例 10 (Met-20K-hGH の活性化)

特開平 10-234386 号の参考例 2 記載の方法で得られた菌体 40 g に PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) 100 ミリリットルを加えて懸濁した後、5 分間、超音波破碎 (ブランソン社) を行い菌体を破碎した。菌体破碎液を遠心分離 (10000 rpm、20 分間) して上清を廃棄し、封入体を得た。この封入体に 50 mM トリス/HCl、8 M グアニジン塩酸塩溶液 (pH 8.0) 2 リットルを加えて封入体を溶解後、遠心分離 (10000 rpm、120 分間) を行った。得られた上清液 2 リットルに 50 mM トリス/HCl、0.28 mM GSSG、1.4 mM GSH、0.7 M アルギニン (pH 8.0) 24 リットルを加えて、4℃ で 1 日間活性化を行った。

【0029】

実施例 11 (Met-20K-hGH の精製)

実施例 10 で活性化の終了した液をミニタン限外濾過システム (PTGC 膜、ミリポア社) で 20 mM トリス/HCl、2.5 M 尿素 (pH 8.0) を加えながら電気伝導度が 10 mS/cm 以下になるまで脱塩、濃縮を行った後、得られた濃縮液を遠心分離 (10000 rpm、20 分間) し、濃縮液の上清 150 ミリリットルを得た。ついでこの液を 50 mM トリス/HCl、2.5 M 尿素/10% アセトニトリル (pH 8.2) で平衡化した HiLoad™ Q Sepharose 16/10 HP カラム (1.6cmΦ x 10 cm、ファルマシア・バイオテク社) に吸着させ、十分に洗浄した後、0~0.18 M 塩化ナトリウムの濃度勾配により流速 3.0 ミリリットル/分で溶出を行い、Met-20K-hGH 画分として 28 ミリリットルの溶出液を得た。さらにこの画分をセントリプラスー 10 (ミリポア社) で濃縮・脱塩を行い、濃縮液 15 ミリリットルを得た。この液を再度、50 mM トリス/HCl、2.5 M 尿素/10% アセトニトリル (pH 8.2) で平衡化した HiLoad™ Q Sepharose 16/10 HP カラム (1.6cmΦ x 10 cm、ファルマシア・バイオテク社) に吸着させ、十分に洗浄した後、A = 50 mM トリス/HCl、2.5 M 尿素、10% アセトニトリル (pH 8.2) 及び B = 50 mM MES [2-(N-メ

グリオキシル酸]、2.5 M 尿素、10% アセトニトリル (pH 4.0) とによる 0~100% B の pH 勾配で 60 分間、流速 3.0 ミリリットル/分で溶出を行い、Met-20K-hGH 画分 12 ミリリットルを得た。この溶出液に 2 M トリス/HCl (pH 7.8) を 0.6 ミリリットル加えて pH を 7.2 に調整し、セントリプラス-10 (ミリポア社) で濃縮を行った。この濃縮液 0.5 ミリリットルを 10% エタノールを含む PBS で平衡化した Superdex™ 75 HR 10/30 (1.0 cmΦ x 30 cm、ファルマシア・バイオテック社) に添加し、10% エタノールを含む PBS で溶出し、Met-20K-hGH 画分 7.5 ミリリットルを得た。

【0030】

実施例 12 (N 末端 Met の除去)

実施例 11 によって得た Met-20K-hGH 溶液 6 ミリリットルを 20 mM トリス/HCl、8 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (10 mm ID x 30 cm、ファルマシアバイオテック社) に通液し、溶出してきた Met-20K-hGH 画分を集め、更に限外濾過システム (ダイアフローメンブレン YM10、25 mm、アミコン社) を使って 2 ミリリットルに濃縮した。この溶液に 2.5 M グリオキシル酸、40 mM 硫酸銅、50% ピリジン溶液 0.5 ミリリットルを加えよく攪拌した後 25℃ で 60 分間反応させた。次いで、この反応液を 20 mM トリス/HCl、4 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (10 mm ID x 40 cm、ファルマシアバイオテック社) に通液し、Met-20K-hGH のジケトン体画分として 4 ミリリットルの溶出液を集めた。この溶出液に 1.2 M 酢酸、2.4 M ギ酸ナトリウム、3.6 M 尿素、48 mM 3,4-ジアミノ安息香酸溶液 20 ミリリットルを加えよく攪拌した後 30℃ で 65 時間反応した。反応後、20 mM トリス/HCl、4 M 尿素 (pH 8.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (20 mm ID x 40 cm、ファルマシアバイオテック社) に通液し、20K-hGH 画分を集めた後、更に高速液体クロマトグラフ法 (ギルソン HPLC システム、ギルソン社) により、この溶液を 50 mM トリス/HCl、2.5 M 尿素/10% アセトニトリル (pH 8.2) で平衡化した HiLoad™ Q Sepharose 16/10 HP

カラム (1.6cmΦ x 10 cm、ファルマシアバイオテク社) に吸着させ、十分に洗淨した後、A = 50 mM トリス / HCl、2.5 M 尿素、10% アセトニトリル (pH 8.2) 及び B = 50 mM MES [2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸]、2.5 M 尿素、10% アセトニトリル (pH 4.0) とによる 0 ~ 100% B の pH 勾配で 60 分間、流速 3.0 ミリリットル / 分で溶出を行い、20 K-h GH 画分 12 ミリリットルを得た。この溶出液に 2 M トリス / HCl (pH 7.8) を 0.6 ミリリットル加えて pH を 7.2 に調整した後、セントリプラスー 10 (ミリポア社) で濃縮を行った。この濃縮液 0.5 ミリリットルを 10% エタノールを含む PBS で平衡化した Superdex™ 75 HR 10/30 (1.0 cmΦ x 30 cm、ファルマシア・バイオテク社) に添加し、10% エタノールを含む PBS で溶出し、20 K-h GH 画分 7.5 ミリリットルを得た。

【0031】

実施例 13 (20 K-h GH の特徴決定)

(a) N 末端アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社、モデル 477A) を用いて決定した。その結果、得られた 20 K-h GH の N 末端アミノ酸配列は cDNA の塩基配列から推定された 20 K-h GH の N 末端アミノ酸配列と一致した (表 4)。

【表4】

残基No	検出された PTH ¹⁾ -アミノ酸 (pmol)	20K-hGHの 塩基配列から予測 されるアミノ酸
1	Phe (642)	Phe
2	Pro (504)	Pro
3	Thr (342)	Thr
4	Ile (410)	Ile
5	Pro (200)	Pro
6	Leu (378)	Leu
7	Ser (95)	Ser
8	Arg (170)	Arg
9	Leu (285)	Leu
10	Phe (262)	Phe

1) フェニルチオヒダントイン

1 nmol の試料を用いて分析を行った。

(b) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計 (システム6300, ベックマン社) を用いて決定した。その結果、実施例 で得られた 20K-hGH のアミノ酸組成は 20K-hGH の cDNA の塩基配列から推定されるアミノ酸組成と一致した (表5)。

【表 5】

アミノ酸	1 モル当たりの	20K-hGHの塩基
	残基数	配列から予想される値
A s x	20. 2	20
T h r ¹⁾	9. 7	10
S e r ¹⁾	16. 5	17
G l x	22. 0	22
P r o	6. 9	7
G l y	8. 0	8
A l a	6. 2	6
C y s ²⁾	N. D.	4
V a l	7. 0	7
M e t	2. 9	3
I l e	6. 5	7
L e u	24. 3	25
T y r	5. 9	6
P h e	12. 2	12
H i s	3. 1	3
L y s	7. 1	7
A r g	10. 7	11
T r p	N. D.	1

酸加水分解 (6N HCl-1%フェノール、110℃、24及び48時間加水分解の平均値)。約20 μ gを用いて分析をおこなった。

1) 0時間に外挿した値。2) 未検出

【0032】

実施例 14 (20K-hGHの活性測定)

実施例 11で得られた20K-hGHのNb2細胞 [ジャーナル・オブ・クリ

ニカル・エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム、51巻、1058頁（1980）] に対する増殖促進効果のあることを確認した。

【0033】

実施例 15

（ヒトMet-BTCの製造）

特開平6-87894（EP-A-0482623）の実施例4～6、8および13に記載の方法に準じて、下記の方法でヒトMet-BTCを製造した。

（大腸菌のヒトBTC cDNA発現プラスミドの構築）

ヒト・プロBTC（1-147アミノ酸残基）をコードする0.6KbのEcoRI-BamHI断片を、特開平6-87894（EP-A-0482623）の実施例5に記載のプラスミドpTB1515から単離した。ATG翻訳開始コドン（5'-TATGGATGGG-3'；5'-AATTCCCATCCA-3'）を有する合成アダプターを上記0.6Kb断片のEcoRI部位に連結した後、生成した0.6Kb NdeI-BamHI断片を、T7プロモーター（Gene、56巻、125頁（1987年））を含有するプラスミドpET-3c中へ挿入し、プラスミドpTB1505を構築した。

ヒトBTCの80アミノ酸残基（特開平6-87894（EP-A-0482623）の図10-1～図10-2の1（Asp）から80（Tyr）まで）をコードするDNA断片を得るため、鋳型としてプラスミドpTB1505、プライマーとして2個のオリゴヌクレオチド（5'-ATACATATGGATGGGAATTCCA-3'；5'-CCGGATCCTAGTAAAACAAGTCAACTCT-3'）を用いてPCR（polymerase chain reaction）を行った。生成物をNdeIおよびBamHIで消化し、2.0%アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とする0.25Kb DNA断片を単離した。この0.25Kb NdeI-BamHI断片を、pET-3cのT7プロモーターの下流にT4 DNAリガゼを用いて連結しプラスミドpTB1516を得た（特開平6-87894（EP-A-0482623）の図13参照）。

（大腸菌でのヒトMet-BTCの発現）

大腸菌MM294を、T7ファージのRNAポリメラーゼ遺伝子で組み換えら

れているラムダファージ（スチュディエ、スプラ）で溶原化した。その後、プラスミド pLys S をこの大腸菌 MM294 (DE3) へ導入し、大腸菌 MM294 (DE3) / pLys S を得た。この菌体に上記参考例で得られたプラスミド pTB1516 を導入し、大腸菌 MM294 (DE3) / pLys S, pTB1516 を得た。

この形質転換細胞を、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンと $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含む LB 培地（1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム）1リットルを含む2リットル容フラスコ中で 37°C 、8時間振とう培養した。得られた培養液を19リットルの主発酵培地（1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第一鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸）を仕込んだ50リットル容発酵槽へ移植して、 30°C で通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500クレット単位になった時点で、 $100 \text{mg}/\text{リットル}$ 分のイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに培養を続け、7時間後に培養を終了した。この培養終了液を遠心分離して、約340gの湿菌体を得、 -80°C に凍結保存した。

この形質転換大腸菌 MM294 (DE3) / pLys S, pTB1516 は、受託番号 FERM BP-3836 として通商産業省工業技術院生命工学工業研究所 (NIH) に寄託され、また受託番号 IFO 15282 として財団法人発酵研究所 (IFO) に寄託されている。

上述の方法により取得した N 末端にメチオニンの付加したヒトベータセルリン (Met-BTC) 10mg を 3M 尿素溶液 4ml に溶解した後、 80mM 硫酸銅 0.25ml 、グリオキシル酸 0.25g 、ピリジン 0.5ml の混合液を加え、 25°C で1時間反応した。反応終了後、反応液を 2.5M 尿素 + 50mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム ($25 \text{mmID} \times 600 \text{mmL}$) に通液し、平衡化に用いた溶液を $6 \text{ml}/\text{分}$ の流速で展開し、Met-BTC のジケトン体画分をプールした。続いてこの画分に等量の 2M 酢酸、4

Mギ酸ナトリウム、3M尿素溶液を加えた後、3、4-ジアミノ安息香酸を40 mM濃度になるように添加して、脱気、窒素ガスシールを行い、25℃で5日間反応した。反応終了後、反応液を50 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(46mmID×600mmL)に通液し、平衡化に用いた緩衝液を10 ml/分の流速で展開し、N末端にメチオニンの付加していないBTC画分をプールした。プールしたBTC画分をpH 6.0に調整後、50 mMリン酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素(pH 5.0)で平衡化したCM-5PW(21.5mmID×150mmL、東ソー(株))に吸着した後、0-100% B(B=50 mMほう酸緩衝液+0.1M NaCl+2.5M尿素、pH 9.0)の段階勾配で60分間、6 ml/分の流速で溶出を行い、BTC画分をプールした。さらに、BTC画分を0.1% TFAで平衡化したC4P-50(10mmID×250mmL、昭和電気(株))に吸着した後、20-60% B(B=80% アセトニトリル/0.1% TFA)の段階勾配で40分間、2 ml/分の流速で溶出した。BTCのフラクションをプールした後、凍結乾燥を行い、BTC約2.6 mgを得た。

【0034】

実施例16 (BTCの特徴決定)

a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例15で得られたBTCをSample buffer [Laemmli, ネイチャー(Nature), 227, 680(1970)]に懸濁し100℃で1分間加熱した後、マルチゲル15/25(第一化学薬品(株))で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue)で染色したところ、単一バンドの蛋白が認められ、精製品はほぼ単一であった(図2)。

b) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(アプライト[®]ハイシステム モデル477A)を用いて決定した。その結果、得られたBTCのcDNAの塩基配列から推定したBTCのN末端アミノ酸配列と一致した(表6)。

【表6】

残基 No.	検出された PTH 1) -アミノ酸 (pmol)アミノ酸	BTC の塩基配列 から予測される (pmol)アミノ酸
1	A s p (261)	A s p
2	G l y (457)	G l y
3	A s n (300)	A s n
4	S e r (107)	S e r
5	T h r (75)	T h r
6	A r g (181)	A r g
7	S e r (121)	S e r
8	P r o (245)	P r o
9	G l u (55)	G l u
10	T h r (71)	T h r
11	A s n (133)	A s n
12	G l y (149)	G l y
13	L e u (132)	L e u
14	L e u (155)	L e u
15	N. D.	C y s
16	G l y (111)	G l y
17	A s p (70)	A s p
18	P r o (65)	P r o
19	G l u (29)	G l u
20	G l u (64)	G l u

1 nmol を用いて分析を行った。

N. D. 未検出

1) フェニールチオヒダントイン

c) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(ベックマン システム6300E)を用いて決定した。その結

果、BTCのcDNAの塩基配列から推定したアミノ酸組成と一致した（表7）

。

【表7】

アミノ酸	1モル当たりの 残基数	BTCの塩基配列 から予測される値
Asx	7.0	7
Thr ¹⁾	6.1	6
Ser ¹⁾	4.8	5
Glx	9.3	9
Pro	3.8	4
Gly	7.1	7
Ala	4.0	4
Cys ²⁾	N. D.	8
Val	3.9	4
Met	0	0
Ile	1.9	2
Leu	3.0	3
Tyr	3.7	4
Phc	3.3	3
His	2.3	2
Lys	5.0	5
Arg	6.9	7
Trp	0	0

酸加水分解（6N塩酸 1%フェノール 110℃、24・48時間、加水分解の
平均値）

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

ca. 20 μ gを用いて分析を行った。

d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（ベックマン システム6300E）を用いて決定した。得ら

れたBTCはcDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致した（表8）。

【表8】

C末端アミノ酸分析

BTC	C末端アミノ酸	回収率（%）
	Tyr	44.6

Vapor-Phase Hydrazinolysis (100℃, 3.5hr).

15nmolを用いて分析を行った。

気相ヒドラジン分解法（100℃，3.5時間）

15nmolを用いて分析を行った。

e) BTCの生物活性

精製品はモレキュラー・セル・バイオロジー、8、588（1988）に記載の方法により、BALB/C3T3 A31-714 クローン4（インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12、463、（1973）を用いた活性測定を行い、標準品と同等の活性を有することを確認した。

【0035】

実施例17

EP-A-812856号の参考例5の方法により取得したN末端にメチオニンの付加したヒトインターロイキン-2（Met-IL-2）50mgを4M尿素溶液40mlに溶解した後、100mM硫酸銅2.5ml、グリオキシル酸2.5g、ピリジン5.0mlの混合液を加え、25℃で1時間反応した。反応終了後、反応液を10mMリン酸緩衝液+2.5M尿素（pH5.0）で平衡化したセファデックス（Sephadex）G-25カラム（46mmID×600mmL）に通液し、平衡化に用いた溶液を10ml/分の流速で展開し、Met-IL-2のジケトン体画分をプールした。続いてこの画分に等量の2M酢酸、4Mギ酸ナトリウム、3M尿素溶液を加えた後、3、4-ジアミノ安息香酸を40mM濃度になるように添加して、脱気、窒素ガスシールを行い、25℃で5日間反応し

た。反応終了後、反応液を 10 mM リン酸緩衝液 + 2.5 M 尿素 (pH 5.0) で平衡化したセファデックス G-25 カラム (46mmID×600mmL) に通液し、平衡化に用いた緩衝液を 10 ml / 分の流速で展開し、N 末端にメチオニンの付加していない IL-2 画分をプールした。プールした IL-2 画分を、25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した SP-5PW (21.5mmID×150mmL、東ソー(株)) に吸着した後、30-80% B (B = 25 mM リン酸緩衝液、pH 8.0) の段階勾配で 60 分間、6 ml / 分の流速で溶出を行い、17.3 mg の IL-2 画分を得た。

【0036】

実施例 18 (IL-2 の特徴決定)

a) SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた分析

実施例 15 で得られた IL-2 を Sample buffer [Laemmli, ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に懸濁し 100℃ で 1 分間加熱した後、マルチゲル 15 / 25 (第一化学薬品(株)) で電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue) で染色したところ、単一バンドの蛋白が認められ、精製品はほぼ単一であった (図 3)。

b) N 末端アミノ酸配列分析

N 末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー (アプライト パーティシステム モデル 477 A) を用いて決定した。その結果、得られた IL-2 の cDNA の塩基配列から推定した IL-2 の N 末端アミノ酸配列と一致した (表 9)。

【表 9】

残基 No.	検出された PTH ¹⁾ -アミノ酸 (pmol)	IL-2 の塩基配列 から予測される アミノ酸
1	Ala (701)	Ala
2	Pro (354)	Pro
3	Thr (359)	Thr
4	Ser (122)	Ser
5	Ser (128)	Ser
6	Ser (78)	Ser
7	Thr (46)	Thr
8	Lys (176)	Lys
9	Lys (61)	Lys
10	Thr (40)	Thr

1 nmol を用いて分析を行った。

N. D. 未検出

1) フェニールチオヒダントイン

c) アミノ酸組成分析

アミノ酸組成をアミノ酸分析計(ベックマン システム6300E)を用いて決定した。その結果、IL-2 のcDNAの塩基配列から推定したアミノ酸組成と一致した(表 10)。

【表10】

アミノ酸	1モル当たりの	1L-2の塩基配列
	残基数	から予測される値
Asx	11.8	12
Thr ¹⁾	12.9	13
Ser ¹⁾	7.0	8
Glx	18.4	18
Pro	4.8	5
Gly	2.0	2
Ala	4.8	5
Cys ²⁾	N. D.	3
Val	3.5	4
Met	3.8	4
Ile	7.7	9
Leu	22.0	22
Tyr	2.8	3
Phe	5.6	6
His	2.9	3
Lys	10.3	11
Arg	3.7	4
Trp	0.9	1

酸加水分解（6N塩酸-4%チオグリコール酸、110℃、24・48時間、加水分解の平均値）

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

d) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（ベックマン システム6300E）を用いて決定した。得られた1L-2はcDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致した（表11）。

【表 11】

C末端アミノ酸分析

I L-2	C末端アミノ酸	回収率 (%)
	Th r	32.5

気相ヒドラジン分解法 (100℃, 3.5時間)

15nmolを用いて分析を行った。

e) I L-2の生物活性

生物活性測定は、I L-2依存細胞を用いる日沼らの方法 [バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem.Biophys.Res.Comm.), 109, 363 (1982)] に従って行い、標準品と同等の活性を有することを確認した。

【0037】

【発明の効果】

本発明により、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチド、蛋白質またはその塩から、該メチオニン残基のみを選択特異的かつ効率的に取り除き、N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチドを効率よく生産することができる。また、本発明の方法によれば、ペプチドまたは蛋白質の種類に拘わらず、しかもマイルドな条件下でN末端のメチオニン残基を化学的に除去することができるので、遺伝子工学的手法により製造されたメチオニンの付加した蛋白質を原料にして、天然型のアミノ酸配列を有する蛋白質を工業的に有利に製造することができる。

【0038】

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例4a)で得られた電気泳動の結果を示す。

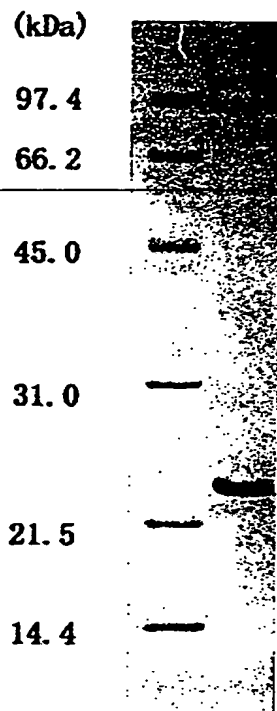
【図2】実施例16a)で得られた電気泳動の結果を示す。

【図3】実施例18a)で得られた電気泳動の結果を示す。

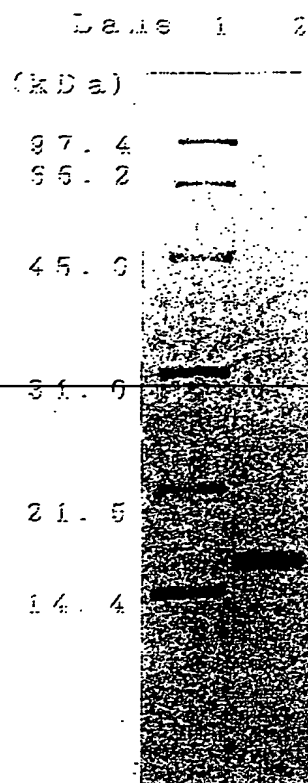
【書類名】 図面

【図 1】

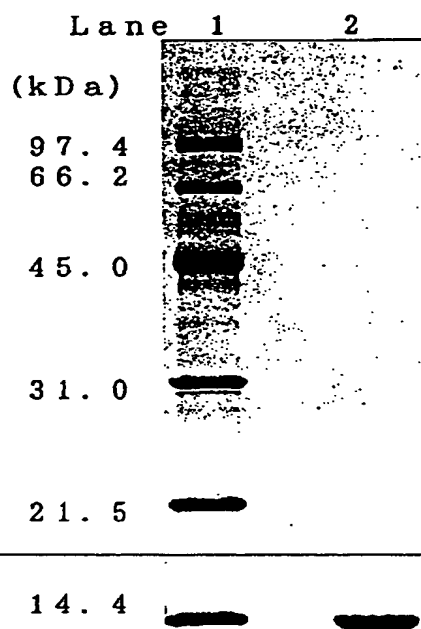
L a n e 1 2



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチド、蛋白質またはその塩から選択特異的かつ効率的に該メチオニン残基を化学的に除去すし、高収率でN末端に酸化されていてもよいメチオニン残基が付加していないペプチド、蛋白質またはその塩する方法を提供する。

【解決手段】N末端に酸化されていてもよいメチオニン残基を有するペプチド、蛋白質またはその塩と α -ジケトン類を反応させた後、酢酸およびギ酸ナトリウムまたはギ酸およびギ酸ナトリウムの存在下に加水分解することを特徴とする該メチオニン残基の除去方法。

【選択図】なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000002934

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】

武田薬品工業株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】

100073955

【住所又は居所】

大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】

朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】

100110456

【住所又は居所】

大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号

武田薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】

内山 務

出願人履歴情報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名 武田薬品工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)